

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/12, C07K 7/08, 7/10 G01N 33/574, 33/68</p>		A1	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 94/10306 (43) Date de publication internationale: 11 mai 1994 (11.05.94)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/01082 (22) Date de dépôt international: 2 novembre 1993 (02.11.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/13110 2 novembre 1992 (02.11.92) FR</p>		<p>(74) Mandataire: PHELIP, Bruno; Cabinet Harlé & Phélip, 21, rue de La Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR). (81) Etats désignés: AU, BB, BG, BR, BY, CA, CZ, FI, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p>	
<p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): LABORATOIRES EUROBIO [FR/FR]; 7, avenue de Scandinavie, F-91953 Les Ulis Cédex B (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): SOUSSI, Thierry [FR/FR]; 70, avenue du Général-Michel-Bizot, F-75012 Paris (FR). LUBIN, Richard [FR/FR]; 49, avenue des 4 Chemins, F-92330 Sceaux (FR). LEGROS, Yann [FR/FR]; 15, rue Pierre-Dupont, F-75010 Paris (FR).</p>		<p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>	
<p>(54) Title: P53 PROTEIN FRAGMENTS AND USE THEREOF FOR DETECTING AND MONITORING DISEASED CONDITIONS (54) Titre: FRAGMENTS DE LA PROTEINE p53 ET LEURS UTILISATIONS DANS LA DETECTION ET LE SUIVI D'ETATS PATHOLOGIQUES (57) Abstract A p53 protein fragment peptide specifically reacting with antibodies to p53 in the body fluids of cancer patients or precarcinomatous individuals. The peptide is preferably included in amino acid sequence 1-112 or 350-393 of protein p53, and may be used for detecting or monitoring diseased conditions, particularly carcinous conditions. (57) Abrégé Peptide, fragment de la protéine p53, présentant une réaction spécifique vis-à-vis d'anticorps anti-p53 présents dans les fluides biologiques de patients atteints d'un cancer ou pré-cancéreux. Préférentiellement, ce peptide est compris dans la séquence des amino-acides 1 à 112 ou dans la séquence 350 à 393 de la protéine p53. Il peut être utilisé pour la détection ou le suivi d'états pathologiques, en particulier d'états cancéreux.</p>			

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures
publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	République slovaque
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République du Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

FRAGMENTS DE LA PROTEINE p53 ET LEURS UTILISATIONS
DANS LA DETECTION ET LE SUIVI D'ETATS PATHOLOGIQUES

La présente demande a pour objet des fragments de la protéine p53 correspondants à des épitopes immunodominants de la protéine p53 humaine.

Elle est d'autre part relative à leurs utilisations dans la détection et le suivi d'états pathologiques et en particulier d'états cancéreux et pré-cancéreux.

Les mutations du gène p53 sont les altérations géniques les plus souvent rencontrées dans les cancers humains. La fréquence des mutations du gène p53 est élevée pour le cancer du colon (1), du sein (2) et du poumon (3) de même que dans les leucémies (4), les ostéosarcomes (5), les cancers de l'ovaire (6), de l'estomac (7), et du cerveau (8). Des mutations héréditaires ont été récemment mises en évidence comme support du syndrome du cancer familial de Li-Fraumeni (9,10). Rapportées aux 10 cancers les plus fréquents dans le monde, les altérations du gène p53 sont retrouvées chez 40 à 45% des cancéreux. Les altérations les plus fréquentes sont des mutations ponctuelles situées dans 4 des 5 régions phylogénétiquement conservées (HCD) de la protéine p53 (11,12).

En 1982, Benchimol et al. ont montré par une technique radio-immunologique que la protéine p53 est spécifiquement surexprimée dans les cellules transformées et indécelable dans les cellules normales (13). De nombreuses études ont confirmé depuis ces résultats et montré que l'accumulation de la protéine p53 est due à sa stabilisation. On sait maintenant que cette stabilisation est due dans presque tous les cas à une mutation ponctuelle qui modifie la conformation et la stabilité de la protéine. Ces observations encouragent l'étude systématique par immunohistologie

de l'expression de la protéine p53 sur une large gamme de tumeurs car il semble y avoir une bonne corrélation entre la mutation du gène p53 et l'accumulation de la protéine (14, 15).

5 En 1982, Crawford et al. ont détecté des anticorps anti-p53 chez des patients présentant un cancer du sein (16). Caron de Fromentel et al. ont ensuite montré en 1987 que de tels anticorps étaient présents dans le sérum d'enfants présentant des
10 cancers très divers (17). La fréquence moyenne est de 12% avec une fréquence particulière de 20% dans le lymphome de Burkitt (17). Plus récemment, Davidoff et al. (18) ont montré que la présence d'anticorps anti-p53 est associée avec des mutations spécifiques des
15 exons 5 et 6 du gène. Ces protéines mutées sont connues pour s'associer à la protéine hsp70 et sont encore plus oncogéniques *in vitro* et *in vivo*.

20 L'importance de ces anticorps sériques a été récemment soulevée par la découverte que leur présence est généralement corrélée avec un mauvais pronostic pour le patient.

25 La partie de la protéine p53 humaine présentant le plus de mutations étant située environ au milieu de la séquence de la protéine p53, on aurait pu supposer que les anticorps de patients atteints de cancer et produisant une telle protéine mutée reconnaissent spécifiquement cette partie centrale de la protéine présentant des mutations. En effet, cette région de la protéine p53 humaine étant différente chez des
30 patients atteints de cancers, il semblait logique de concevoir que la réponse immunitaire de l'organisme serait préférentiellement dirigée contre la région modifiée.

35 Le demandeur a montré de manière surprenante que les régions reconnues par les anticorps des

patients ne correspondent pas aux régions de la p53 modifiées dans les cancers mais à d'autres régions de la protéine p53 humaine qui sont situées dans les extrémités amino et carboxy-terminales de la p53. Ce 5 résultat original ne pouvait être prédict par aucune étude antérieure.

On notera que dans les années 1980-1985, de nombreux anticorps monoclonaux murins ont été produits soit contre la p53 murine, soit contre la p53 humaine. 10 Deux études ont porté sur la caractérisation de ces anticorps monoclonaux. Banks et al.(22) ont décrit la production d'anticorps monoclonaux murins dirigés contre la p53 humaine. L'un de ces anticorps (PAb1801) est très utilisé dans divers laboratoires à l'heure 15 actuelle. En utilisant des protéines p53 tronquées, ces auteurs ont montré que l'épitope reconnu par PAb1801 ou Pab1803 est compris entre les acides aminés 32 et 79.

Dans un autre article, WADE-EVANS et JENKINS 20 (30) ont cartographié les épitopes de 4 anticorps monoclonaux dirigés contre la p53 de souris. Pour cette étude, ils ont utilisé des fragments de protéine p53 murine. Les résultats sont les suivants: l'anticorps PAb242 reconnaît un épitope situé entre 25 les acides aminés 9 et 25, l'anticorps PAb246 reconnaît un épitope situé entre les acides aminés 88 et 109, l'anticorps PAb248 reconnaît un épitope situé entre les acides aminés 157 et 192 et l'anticorps PAb421 reconnaît un épitope situé entre les acides 30 aminés 370 et 378.

L'ensemble de ces études montre que les épitopes reconnus par ces anticorps monoclonaux sont répartis sur tout le long de la protéine.

La présente invention a pour objet des peptides 35 ou des fragments protéiques, à l'exclusion de la

protéine p53, présentant une réaction spécifique vis-à-vis des anticorps anti-p53 présents dans les fluides biologiques de patients précancéreux ou atteints d'un cancer quel que soit son origine .

5 Avantageusement , un tel peptide est compris dans la séquence des acides aminés de la région amino terminale (résidus 1 à 112) ou dans la région carboxy terminale (résidus 350 à 393) de la protéine p53. La séquence de la protéine p53 humaine sauvage est
10 décrite par SOUSSI et al (26).

Il comprend avantageusement en partie ou en totalité l'une des séquences suivantes :

Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu
Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro
15 Leu (SEQ ID NO:1)

Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile.
Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro (SEQ ID
NO:2).

20 Préférentiellement , un tel peptide comprend en partie ou en totalité l'une des séquences suivantes :

Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser
Asp Leu Trp Lys Leu (SEQ ID NO:3)

Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu
Leu Pro Glu Asn Asn (SEQ ID NO:4)

25 Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn
Val Leu Ser Pro Leu(SEQ ID NO:5)

Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile
Glu Gln Trp Phe Thr (SEQ ID NO 6)

30 Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr
Glu Asp Pro Gly Pro (SEQ ID NO:7).

Si un tel peptide est compris dans la séquence des acides aminés 350 à 393 de la protéine p53, il comprend alors préférentiellement en partie ou en totalité l'une des séquences suivantes :

35 Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp Ala Gln Ala

Gly Lys Glu Pro Gly (SEQ ID NO : 8)
Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly
Gly Ser Arg Ala His (SEQ ID NO:9)
Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His
5 Ser Ser His Leu Lys (SEQ ID NO:10)
Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His Leu Lys
Ser Lys Lys Gly Gln (SEQ ID NO:11)
Ser Ser His Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln
Ser Thr Ser Arg His (SEQ ID NO: 12)
10 Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His
Lys Lys Leu Met Phe (SEQ ID NO:13)
Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe
Lys Thr Glu Gly Pro (SEQ ID NO:14)
Lys Lys Leu Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro
15 Asp Ser Asp (SEQ ID NO:15).

La détermination des fragments de la protéine p53 présentant une réaction spécifique vis-à-vis des anticorps de patients atteints d'un cancer peut se faire par les moyens mis à la disposition de l'homme du métier et en particulier par test immunoenzymatique, radio-immunologique, par immuno-précipitation ou par immunoblot.

De tels tests sont bien connus de l'homme du métier et sont décrits dans des manuels généraux (28,29).

La présente invention est en outre relative à une séquence nucléotidique , ribonucléotidique (ARN) ou désoxyribonucléotidique (ADN), codant pour la synthèse d'un des peptides objet de la présente demande .

De tels peptides peuvent être utilisés pour la détection ou le suivi d'états pathologiques, et en particulier pour la détection ou le suivi d'états cancéreux et précancéreux.

35 Un autre objet de la présente invention est un

procédé pour la détermination de la présence d'anticorps ou pour leur dosage dans un tissu ou un fluide caractérisé en ce que :

5 - on met en présence le tissu ou le fluide et l'un des peptides objet de l'invention précédemment décrits , et

- on détermine la présence soit de l'anticorps, soit du peptide soit du couple anticorps-peptide et on effectue le dosage correspondant .

10 Le dosage des complexes anticorps-peptides peut être effectué soit par dosage de la liaison anticorps peptide, soit par dosage du peptide ou de l'anticorps capté et rentrant dans le complexe anticorps-peptide.

15 Ce dosage peut être effectué par les méthodes connues de l'homme du métier et en particulier par des méthodes physiques ou immunologiques telles que les méthodes immunoenzymologiques, radioimmunologiques ou chimioimmunologiques ou par des approches plus récentes qui sont basées sur les nouvelles techniques
20 de biologie moléculaire telles que l'immuno-PCR. Selon cette technique, le complexe antigène-anticorps est détecté par une réaction de PCR qui met en jeu un oligonucléotide lié à l'anticorps de révélation. Le complexe est ensuite visualisé par électrophorèse.

25 Avantageusement, les anticorps dont on détermine la présence ou que l'on dose sont des anticorps représentatifs d'états pathologiques et en particulier d'états cancéreux ou pré-cancéreux.

Afin de mettre en oeuvre le procédé, le peptide
30 peut être fixé sur une phase solide.

Les complexes formés peuvent être révélés à l'aide d'un anticorps réagissant spécifiquement avec le peptide ou les anticorps à doser ou à détecter . Cet anticorps permettant la révélation des complexes
35 est avantageusement conjugué à un marqueur afin de

mettre en évidence le complexe anticorps-peptide .

Un tel marqueur peut être un enzyme, une molécule chimioluminescente, bioluminescente, fluorescente ou radioactive.

5 Un tel procédé peut être avantageusement mis en oeuvre à l'aide d'un coffret pour le dosage et à la détermination d'anticorps comprenant au moins:

- une préparation d'un ou plusieurs des peptides tels que précédemment décrits et
- 10 - un moyen permettant la révélation de la réaction ou de l'absence de réaction entre l'un de ces peptides et les anticorps à doser .

15 Le complexe peptide anticorps formé lors de la réaction est avantageusement révélé à l'aide d'un anticorps conjugué à un marqueur tel que défini ci-dessus ou à l'aide de toutes molécules capables de détecter la présence d'un tel complexe.

20 Les peptides objets de la présente invention sont préférentiellement obtenus par synthèse à partir d'acides aminés par tous moyens connus de l'homme du métier .

Ils peuvent aussi être obtenus par génie génétique ou par découpage enzymatique ou chimique de la protéine p53.

25 Les anticorps permettant la révélation du complexe formé entre le peptide et les anticorps sont avantageusement dirigés contre des déterminants antigéniques spécifiques de l'espèce dont est originaire le fluide ou le tissu . Ainsi, dans le cadre de dosage d'anticorps d'origine humaine, les anticorps permettant la révélation du complexe seront des anticorps anti-humain.

30 La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par les exemples qui suivent dans lesquels :

La figure 1 représente les profils d'interaction entre les fragments de la protéine p53 et des anticorps présents dans le sérum de différents patients ayant un cancer. Les anticorps utilisés pour les hybridations des figures 1A à 1F sont respectivement un sérum de lapin CM1 immunisé avec la protéine p53, un sérum de souris immunisé avec la protéine p53, trois sérum de patients dont il avait été déterminé qu'ils possédaient des anticorps anti-p53 et un témoin constitué par un anticorps anti-phosphatase alcaline.

Les figures 2 à 7 représentent la réactivité de 77 peptides correspondant à la protéine p53, vis-à-vis de sérum de trois patients atteints de cancers du poumon numérotés 84, 37, 109, et de trois patients atteints de cancer du sein numérotés 57, 27 et 29.

Le complexe anticorps/peptides est révélé par colorimétrie et la densité optique est mesurée par un lecteur de microplaques.

La figure 8 illustre la fréquence de reconnaissance (en ordonnée) de 77 peptides (en abscisse) par différents sérum de patients atteints de cancers.

Les abréviations suivantes sont utilisées dans les exemples :

ER, récepteur oestrogène
HCD, Domaine Hautement Conservé (highly conserved domain) de la protéine p53
hsp70, protéine du choc thermique de 70 kilodaltons
MAB, anticorps monoclonal
PBS, tampon phosphate
PBST, PBS avec 0,1% Tween 20
PBSTM, PBS avec 0,1% Tween 20 et 3% poudre de lait écrémé
PCR, réaction de polymérisation en chaîne (polymerase

chain reaction).

PhoA, Phosphatase alcaline d'E.coli

PR, récepteur progestérone

SDS, sodium dodécy1 sulfate

5 EXEMPLE 1 -

Mise en évidence et signification des anticorps anti-p53 présents dans le sérum de patients atteints de cancer et localisation des régions de la protéine p53 reconnues par ces anticorps.

10 1) MATERIELS ET METHODES

1.1 SERUMS.

Les sérums de 80 malades présentant un carcinome invasif du sein et de 20 malades avec des métastases ont été réunis après diagnostic histopathologique et conservés à -20°C.

15 1.2 Anticorps monoclonaux

Des souris BALB/c d'haplotype H-2d sont immunisées par voies intrapéritonéale avec 100 µg de p53 humaine normale. Une injection de rappel est effectuée par voie intraveineuse avec 80µg de protéine de même origine. Quatre jours après le rappel, les splénocytes sont prélevés et fusionnés avec des cellules de myélome NS-1 en présence de polyéthylène glycol (PEG 1500 Boehringer). Après sélection en milieu additionné de 1 % d'Hypoxanthine Aminopterine Thymine (HAT) (Gibco), la sécrétion d'anticorps par les hybridomes a été recherchée par un test ELISA en utilisant la p53 humaine comme antigène. Les hybridomes secrétant des anticorps capables de reconnaître la p53 ont été clonés par la technique de dilution limite.

30 Pour la localisation des épitopes sur la p53 humaine, nous avons utilisé une série de peptides chevauchants (longueur de 15 acides aminés (aa), chevauchement de 10 aa) couvrant l'intégralité de la

protéine p53. On dispose d'une série de 77 peptides biotinylés correspondant à la totalité de la p53. Les 76 premiers peptides à partir de l'extrémité N-terminale ont une longueur de 15 acides aminés chacun et le 77ème peptide ne comprend que 13 acides aminés.

L'anticorps H111 reconnaît un épitope compris entre les acides aminés 291 et 300, l'anticorps HR231 reconnaît un épitope compris entre les acides aminés 371 et 380 et HT 216 reconnaît un épitope compris entre les acides aminés 1 à 64.

1.3 EXPRESSION DE FRAGMENT DE p53

Le vecteur pLip4 a été utilisé pour la production des protéines hybrides. Ce plasmide est dérivé de pLip1 (21) dans lequel deux sites de restriction Sac I et Sal I sont introduits entre les codons +6 et +7 du gène E.coli PhOA. Après clonage, la protéine de fusion PhoA est exportée dans le périplasme bactérien et peut en être extraite par choc osmotique à froid (21).

La protéine p53 a été découpée en 6 fragments bien définis. Les fragments 2 (résidus 108 à 162), 3 (résidus 158 à 219), 4 (résidus 215 à 267) et 5 (résidus 263 à 310) contiennent respectivement les régions HCD II à V et correspondent aux sites privilégiés pour les mutations (régions HOT-SPOT) dans les cancers humains (11,12).

Les fragments 1 (résidus 1 à 112) et 6 (résidus 306 à 393) correspondent aux régions amino- et carboxy-terminales de la protéine et sont généralement à l'écart des mutations.

Les fragments précis d'ADNc de la p53 humaine (clone H8, Varda Rotter, Institut Weissman, Israël) ont été amplifiés par PCR utilisant la Vent-DNA polymérase pour réduire les erreurs d'incorporation puis sous clonés dans un vecteur pLIP4. Les clones

positifs sont contrôlés pour l'activité phosphatase alcaline et séquencés directement.

Les six fragments fusionnés au gène PhoA peuvent être exprimés dans E.coli comme des protéines solubles. Le rendement d'expression de protéine de fusion avec le fragment 6 est plus bas (2 à 5 fois) que pour les autres fragments .

L'antigénicité de la protéine exprimée est établie par sa réactivité avec différents anticorps monoclonaux . (voir tableau 2). PAb1801 (22) et HT 216 sont spécifiques du fragment 1; l'épitope PAb240 est localisé sur le fragment 3 (23). H111 est sur le fragment 5; HR 231 et PAb122 (24) sont spécifiques de la région carboxy-terminale de la p53 (fragment 6). Tous ces anticorps monoclonaux réagissent en immunoblot et immunoprecipitation avec la protéine de fusion pLIP4 en accord avec la localisation de leur épitope (voir tableau 2).

1.4 METHODE D'ANALYSE DES FRAGMENTS p53 PAR IMMUNOBLOT.

L'Immunoblot a été réalisé tel que décrit par Towbin et al. (20). Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide (10% acrylamide) en tampon Tris-Glycine contenant 0,1 % de SDS, pH 8,3. Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (2 heures, 40 volts); la membrane est immergée en tampon PBSTM pour saturer les sites de fixation non spécifiques puis lavée 5 fois au PBST.

Pour le Western blot du sérum du patient et de l'extrait d'E.coli, plusieurs pré-incubations sont nécessaires pour diminuer les liaisons non spécifiques à la membrane de nitrocellulose et éliminer les anticorps anti-phosphatase présents dans certains sérums. Les sérums sont d'abord incubés avec l'extrait

bactérien exprimant la phosphatase alcaline E.coli pendant une heure à +4°C puis sur une membrane de nitrocellulose contenant un extrait bactérien (sans protéine de fusion) 12 heures à +4°C.

5 La membrane de nitrocellulose avec les protéines hybrides est incubée avec les sérum préparés et dilués du 1/100 au 1/500 pendant 1 heure en tampon PBSTM à température de la pièce . Après 5 lavages en PBSTM, les membranes sont incubées 1 heure
10 avec un anticorps de lapin anti-souris conjugué peroxydase (dilué au 1/4000 en tampon PBSTM), lavées 5 fois en tampon PBS et révélées par le Luminol (Amersham^R).

15 Après lecture et interprétation , les filtres sont contrôlés par réaction immunologique (Immunoblot) pour la quantité de protéine de fusion effectivement déposée en incubant la membrane avec un anticorps anti-phosphatase alcaline.

20 L'immunoprecipitation et l'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE) ont été réalisés selon la technique décrite par Soussi et al. (19).

2) RESULTATS

2.1 Anticorps anti-p53 et résultats cliniques.

25 Les sérum de 100 patients avec un cancer du sein sont testés pour la présence d'anticorps par immunoprecipitation et Western blot (Tableau 1) . Les anticorps circulant sont détectés chez 14% des patients tous stades cliniques confondus.

30 La fréquence est légèrement plus élevée que celle rapportée par Crawford et al. (10%) (16), en raison sûrement de l'utilisation de protéine purifiée recombinante p53 à la place de lysat cellulaire.

35 Il n'y a pas de corrélation entre la présence d'anticorps et le stade clinique de la maladie. Aucune différence de fréquence en fonction de la taille de la

tumeur ou de la dissémination ganglionnaire n'a été montrée. Il n'y a pas de corrélation avec d'autres paramètres cliniques tels que l'âge , le statut hormonal. Par contre une corrélation a été établie 5 avec le stade histologique de la tumeur (SBR stade 3), un marqueur pronostic indépendant dans les cancers primitifs du sein . Ceci est confirmé par l'association entre la présence d'anticorps et l'absence de récepteurs hormonaux (ER-PR).

10 2.2 Analyse des régions de la protéine p53 impliquées dans la réponse immune.

Pour déterminer si la réponse immunitaire est dirigée contre la p53 mutante ou sauvage, tous les 15 sérum positifs et plusieurs sérum négatifs sont contrôlés par immunoprécipitation contre différents mutants p53 (His175, Val 143 et Pro156). La reconnaissance des types sauvages et mutants par les sérum est identique.

Dans une seconde série d'expériences , le sérum 20 CM1 (25) a été contrôlé . CM1 est un anticorps polyclonal de lapin obtenu par immunisation avec la p53 humaine hautement purifiée et fréquemment utilisée en immunocytochimie (24). Les techniques de Western blot ont montré que le sérum CM1 contient des 25 anticorps qui reconnaissent principalement les fragments 1 et 6 et à un moindre degré le fragment 5. Des résultats similaires sont obtenus par immunoprécipitation . Une expérience de contrôle avec un anticorps anti-phosphatase alcaline permet 30 d'établir que des quantités identiques des différentes protéines de fusion sont bien présentes sur le gel (figure 1). Pour élargir des observations nous avons contrôlé le sérum d'une souris immunisée avec de la p53 immunopurifiée. Le profil de reconnaissance est 35 quasiment identique à celui du sérum CM1. Des

résultats identiques ont été obtenus avec trois autres souris.

L'ensemble de ces résultats permet d'établir que les parties amino et carboxy terminales de la protéine p53 sont très immunogènes chez l'animal immunisé et correspondent à des réponses préférentielles alors que le fragment 5 a une réponse plus faible. Des temps d'exposition radiographique allongés n'ont pas permis de mettre en évidence une reconnaissance des fragments 2 à 4 tant par immunoprécipitation que par immunohybridation (immunoblot).

On a testé le profil de reconnaissance des sérums de malades contenant des anticorps anti-p53 (figure 1 et tableau 3). Les immuno hybridations réalisées ont clairement montré que la réponse immunitaire chez les patients est dirigée principalement contre des épitopes localisés dans les fragments 1 et 6 de la p53. Le sérum de certains patients reconnaît seulement le fragment 1, mais aucun ne reconnaît uniquement le fragment 6 ce qui laisse supposer que la réponse primaire est dirigée principalement contre le fragment 1. Des résultats semblables sont obtenus par immunoprécipitation. De même que chez l'animal, il existe quelques variations dans la réponse immunitaire et quelques patients ont des anticorps dirigés contre les fragments 4 et 5. Aucun anticorps dirigé contre les fragments 2 et 3 n'a pu être détecté. Ce phénomène n'est pas spécifique au cancer du sein. Des résultats identiques ont été obtenus avec des sérums de patients ayant des carcinomes de l'ovaire ou du poumon (figure 1 et exemple 2).

Ces résultats établissent clairement que la partie amino terminale de la p53 contient un ou plusieurs épitopes dominants impliqué dans la réponse

immunitaire cellule B chez des patients présentant des cancers divers. La région carboxy terminale contient aussi un ou plusieurs épitopes immunodominant mais leur importance est moindre par rapport à la région amino terminale.

5 **EXEMPLE 2:**

10 Mise en évidence des épitopes reconnus par les anticorps anti-p53 présents dans le sérum de malades atteints de divers types de cancer : analyse avec des peptides de synthèse .

15 **1) MATERIELS ET METHODES**

Les plaques de microtitration utilisées sont des plaques en polychlorure de vinyle à fond plat, à 96 puits. Ref: M129B, Société Dynatech.

15 La streptavidine en poudre, référence (S4762) , Société Sigma.

Peptides biotinilés synthétisés par la Société CAT (Angleterre)

20 Une série de peptides chevauchants (longueur de 15 acides aminés (aa) , chevauchement de 10 aa) couvrant l'intégralité de la protéine p53. On dispose actuellement d'une série de 77 peptides biotinylés correspondant à la totalité de la p53. Les 76 premiers peptides à partir de l'extrémité N-terminale ont une longueur de 15 acides aminés chacun et le 77ème peptide ne comprend que 13 acides aminés (SEQ ID NO:15) .

25 2 peptides témoins ne correspondant pas à la protéine p53 sont utilisés comme témoin négatif.

30 Tablette ABTS 50 mg; ref 1112422, Boehringer

Tampon ABTS ref 1112597, Boehringer

Anti human couplé à la peroxydase IgG-GAH;

PDSOF, Silenus

Lait en poudre

35 **METHODES DU TEST ELISA**

PREPARATION DES PLAQUES DE MICROTITRATION.

100 µl de streptavidine (concentration 5µg/ml dans l'eau distillée) sont déposés dans les puits de la plaque.

5 Les plaques sont ensuite incubées à 37°C dans une étuve sèche pendant 48 heures. Après cette étape de déshydratation, elles peuvent être emballées individuellement et stockées pendant plusieurs mois à 4°C.

10 LAVAGE :

Les plaques déshydratées sont lavées 5 fois avec du PBS (phosphate buffer saline) contenant 0,05% Tween 20. Ce tampon PBS avec du Tween (PBS-T) sera utilisé tout le long de l'expérience comme solution de lavage. Les 5 lavages se font de manière usuelle en utilisant 200 µl de tampon PBS-T par puits.

Après le dernier lavage, la plaque est séchée sur un papier absorbant. Tous les lavages sont effectués de cette façon.

20 SATURATION

100 µl de solution de saturation sont ajoutés dans chaque puits.

solution de saturation: tampon PBS
0,2 % Tween 20
25 5% Lait

Les plaques sont ensuite incubées 1 heure à 37°C avec une légère agitation puis sont ensuite lavées comme indiqué précédemment.

ADDITION DES PEPTIDES BIOTYNILES

30 50 µl de solution de peptides (125 nanogrammes de peptide dilué dans du tampon PBS contenant 0,1 % de Sérum Albumine Bovine et 0,02% d'azide de sodium) sont ajoutés dans chaque puits.

Chaque puits reçoit un peptide différent 35 correspondant à une région précise de la p53.

Les plaques sont incubées 1 heure à 20°C avec une légère agitation et sont ensuite lavées comme indiqué précédemment .

ADDITION DES SERUMS DES PATIENTS

5 Les sérum à tester sont dilués au 1/50 dans une solution de PBS contenant du lait à 5%.

50 µl de sérum ainsi dilué sont ajoutés dans chaque puits de la plaque.

10 Les plaques sont incubées 1 heure à 20°C avec une légère agitation et sont ensuite lavées comme indiqué précédemment .

INCUBATION AVEC L'ANTICORPS SECONDAIRE.

15 100 µl d'anticorps monoclonal anti-immunoglobuline humaine sont ajoutés dans chaque puits (commercialisé par Silenus, anticorps dilué au 1/2500 dans du PBS 5% lait).

20 Les plaques sont incubées 30 minutes à 37°C avec une légère agitation et sont ensuite lavées comme indiqué précédemment .

20 REVELATION.

100 µl de substrat (ABTS 1 mM, commercialisé par Boerhinger) sont ajoutés dans chaque puits.

Les plaques sont incubées à 20°C avec une légère agitation.

25 Le résultat est lu dans un appareil de lecture ELISA (405 nm) 15 minutes, 30 minutes et 60 minutes après addition du substrat .

2) RESULTATS OBTENUS

30 Dans l'exemple 1 deux phénomènes ont été mis en évidence.

i) La présence d'anticorps anti-p53 est retrouvée chez les patients ayant une forme agressive de cancer du sein (mauvais pronostic).

35 ii) Les anticorps anti-p53 reconnaissent principalement une région de 112 acides aminés situés

5 dans la partie amino terminale de la p53 ainsi qu'une région carboxy terminale localisée entre les résidus 306-393. L'étude ne pouvait pas permettre de détailler plus précisément la région reconnue par les anticorps anti-p53.

L'étude décrite dans cet exemple présente une étude très détaillée de ces régions.

10 Une analyse de plus de 1 000 sérum de patients atteints de divers types de cancers a été faite. 47 sérum positifs ont été choisis pour une étude très détaillée afin de déterminer la nature exacte des épitopes que reconnaissent les anticorps sériques.

15 Ces 47 sérum contenant des anticorps anti-p53 ont été testés sur une série de 77 peptides couvrant l'intégralité de la protéine p53 humaine sauvage. La méthode utilisée est la détection ELISA .

Des exemples de résultats obtenus sont décrits dans les figures 2 à 7.

20 L'ensemble des résultats est résumé dans le tableau 5.

Dans ce tableau, les peptides donnant une réponse comprise entre 50 et 100 % de la valeur maximale de l'ELISA ont été indiqués en noir. Les peptides donnant une réponse comprise entre 20 et 50 % de la valeur maximale de l'ELISA ont été indiqués en gris.

Les initiales des cancers étudiés sont les suivantes :

30 LC: cancer du poumon
UC: cancer de la vessie
PA: cancer du pancréas
BC: cancer du sein
BL: lymphome de Burkitt
H : cancer du foie
35 OV: cancer de l'ovaire

L : leucémie

TY: cancer de la thyroïde

PR: cancer de la prostate.

La figure 8 illustre les fréquences obtenues
5 pour chacun de ces peptides.

Cet histogramme montre la fréquence de reconnaissance de chaque peptide par les 47 sérums étudiés (voir tableau 5). Il montre, par exemple, que 40% des sérums reconnaissent au moins le peptide 3 et 10 que 63% reconnaissent au moins le peptide 4. 98% des sérums reconnaissent au moins l'un des 5 peptides de la région aminotermendale (N-ter) tandis que seulement 15 47% reconnaissent l'un des peptides de la région carboxy terminale (C-ter). Bien sur, 100% des sérums reconnaissent l'un des 13 peptides décrits dans ce tableau.

L'ensemble de ces résultats montre que 98% des sérums de malades reconnaissent au moins l'un des épitopes présents dans les 5 peptides de la région amino terminale. 47% des sérums reconnaissent au moins un des peptides de la région carboxy terminale.
20

Il apparaît donc que l'utilisation de ces peptides, amino ou carboxy terminaux, sont d'une importance majeure dans la possibilité de mettre au point un test ELISA pour mesurer la présence de ces anticorps dans le fluide biologique de patients atteints de cancers ou d'états précancéreux.
25

TABLEAU 1

Corrélation entre le taux d'anticorps anti-p53
dans le sérum et les paramètres cliniques et

histologiques de patients atteints d'un cancer du sein

	Paramètres cliniques	N°	P
5	Patients atteints par des métastases ou ayant subi une rechute	3/20	
10	cancer primaire du sein	17/80	
	Taille de la tumeur		
	T ₀ -T ₁	2/21	
	T ₂	7/33	NS
	T ₃	2/19	
15	T ₄	1/7	
	Etat des nodules lymphatiques		
	N _o	4/32	NS
	N-	7/43	
20	Catégorie histologique		
	catégories 1 et 2	5/59	<0.05
	catégorie 3	6/17	
	Etat des récepteurs hormonaux		
	ER + PR +		
25	ER- PR +	2/34	<0.05
	ER+ PR-		
	ER- PR-	5/13	

NS = non significatif .

TABLEAU 2
Caractérisation des fragments de p53 clonés dans le plasmide PLIP4

Anticorps monoclonaux	Ref.	Fragments de p53					
		1	2	3	4	5	6
PAb1801	23	+	-	-	-	-	-
PAb122	26	-	-	-	-	-	+
PAb240	25	-	-	+	-	-	-
HR231	24	-	-	-	-	-	-
HT216	24	+	-	-	-	-	+
H111	24	-	-	-	-	-	-

TABLEAU 3

Caractérisation des déterminants antigéniques de la p-53 par les anticorps sériques de patients atteints par un carcinome

Patients (1)	p53(2)	Prot 1	Prot 2	Prot 3	Prot 4	Prot 5	Prot 6	Prot 7
26	++	++	-	-	-	+	+	-
33	++	++	-	-	-	-	+	-
37 (3)	++	++	-	-	-	-	-	-
57	++	++	-	-	-	-	-	-
60	++	++	-	-	+	++	-	-
63	++	+	-	-	-	-	-	-
80 (4)	++	++	-	-	-	-	-	-
84 (3)	++	++	-	-	-	-	-	-
90	++	++	-	-	-	-	-	-
94	++	++	-	-	-	-	-	-
103	++	+	-	-	-	-	-	-
109	++	++	+	-	+	-	-	-
134	++	++	-	-	-	-	-	-

Prot = fragment protéique.

- (1) Tous les patients sont atteints par un cancer du sein sauf indications contraires
- (2) p-53 humaine intacte
- (3) carcinome pulmonaire
- (4) carcinome des ovaires.

23

TABLEAU 4

TABLEAU 4 (suite)

30

TABLEAU 4 (suite)

BIBLIOGRAPHIE

1. Baker S.J. Preisinger A.C. Jessup J.M. Paraskeva C., Markowitz S., Wilson J.K.V., Hamilton S. and Vogelstein B. P53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.*, 50: 7717-7722, 1990.
2. Prosser J. Thompson A.L., Cranston G. and Evans H. J. Evidence that p53 behaves as a tumour suppressor gene in sporadic breast tumours. *Oncogene*, 5: 1573-1579, 1990.
3. Takahashi T., Nau M.M., Chiba I., Birrer M.J., Rosenberg R.K. Vinocour M., Levitt M., Pass H., Gazdar A.F. and Minna J.D. P53 a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science*, 246: 491-494, 1989.
4. Gaidano G. Ballerini P., Gong J.Z., Inghirami G., Neri A., Newcomb E.W. Magrath I.T., Knowles D.M. and Dallafavera R. P53 mutations in human lymphoid malignancies - association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5413-5417, 1991.
5. Miller C.W. Aslo A. Tsay C., Slamon D., Ishizaki K, Toguchida J., Yamamuro T., Lampkin B. and Koeffler H.P. Frequency and structure of p53 rearrangements in human osteosarcoma. *Cancer Res.*, 50: 7950-7954, 1990.
6. Mazars R., Pujol P., Maudelonde T., Jeanteur P. and Theillet C. p53 mutations in ovarian cancer -A late event. *Oncogene*, 6: 1685-1690, 1991.
7. Kim J.H. , Takahashi T., Chiba I., Park J.G., Birrer M.J., Roh J.K., Lee H.D. , Kim J.P., Minna J.D. and Gazdar A.F. Occurrence of p53-gene abnormalities in gastric carcinoma tumors and cell lines. *J. Nat. Cancer Inst.*, 83: 938-943, 1991.

8. Mashiyama S., Murakami Y., Yoshimoto T., Sekiya T. and Hayashi K. Detection of p53 gene mutations in human brain tumors by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene*, 6: 1313-1318, 1991.
9. Malkin D., Li F.P., Strong L.C., Fraumeni J.F., Nelson C.E., Kim D.H. Kassel J., Gryka M.A., Bischoff F.Z. Tainsky M. A. and Friend S.H. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms, *Science*, 250: 1233-1238, 1990.
10. Srivastava S., Zou Z.Q., Piroollo K., Blattner W. and Chang E.H. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with li-fraumeni syndrome. *Nature*, 348: 747-749, 1990.
11. Caron de Fromentel C. and Soussi T. P53 Tumor suppressor gene : a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chrom Cancer*, 4: 1-15, 1992.
12. Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B. and Harris C. C. P53 mutations in human cancers. *Science*, 253: 49-53, 1991.
13. Benchimol S., Pim D. and Crawford L. Radioimmunoassay of the cellular protein p53 in mouse and human cell lines. *EMBO J.*, 1: 1055-1062, 1982.
14. Hall P.A., Ray A., Lemoine N.R. Midgley C.A., Krausz T. and Lane D.P. P53 immunostaining as a marker of malignant disease in diagnostic cytopathology. *Lancet*, 338: 513, 1991.
15. Cattoretti G., Rilke F., Andreolo S., D'amato L. and Delia D. P53 expression in breast cancer. *Int. J. Cancer*, 41: 178-183, 1988.
16. Crawford L.V., Pim D.C. and Bulbrook R.D. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int. J. Cancer*, 30: 403-408, 1982.

17. Caron de Fromentel C., May-Levin F., Mouriesse H., Lemerle J., Chandrasekaran K. and May P. Presence of circulating antibodies against cellular protein p53 in a notable proportion of children with B-cell lymphoma. *Int. J. Cancer*, 39: 185-189, 1987.
- 5 18. Davidoff A.M., Iglehart J.D. and Marks J.R. Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers. *Proc Natl. Acad. Sci USA*, 89: 3439-3442, 1992.
- 10 19. Soussi T., Caron de Fromentel C., StYrzbecher H.W., Ullrich S., Jenkins J. and May P. Evolutionary conservation of the biochemical properties of p53- specific interaction of xenopus-laevis p53 with simian virus 40 large T-antigen and mammalian heat shock proteins- 70. *J. Virol.*, 63: 3894-3901, 1989.
- 15 20. Towbin H., Staehelin R. and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad. Sci. USA*, 76: 4350-4354, 1979.
- 20 21. Gillet D., Ducancel F., Pradel E., Léonetti M., Ménez A. and Boulain J.C. Insertion of a disulfide containing neurotoxin into *E. coli* alkaline phosphatase: the hybrid protein retains both biological activities. *Protein Engng*, 5: 273-278, 1992.
- 25 22. Banks L., Matlashewski G. and Crawford L. Isolation of human-p53 specific monoclonal antibodies and their use in the studies of human p53 expression. *Eur. J. Biochem.*, 159: 529-534, 1986.
- 30 23. Stephen C. W. and Lane D.P. Mutant conformation of p53- precise epitope mapping using a filamentous phage epitope library . *J. Mol. Biol.*, 225: 577-583, 1992.

24. Gurney E.G., Harrison R. O. and Fenno J. Monoclonal antibodies against simian virus 40 T antigens; evidence for distinct subclasses of large T antigen and for similarities among nonviral T antigens. *J. Virol.*, 34: 752-763, 1980.

5

25. Midgley C.A., Fisher C.J., Bartek J. Vojtesek B., Lane D. and Barnes D. Analysis of p53 expression in human tumors: an antibody raised against human p53 expressed in *E. coli*. *J. Cell Science*, 101: 10 183-189, 1992.

26. Soussi T., Caron de Fromentel C. and May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene*, 5: 945-952, 1990.

27. Harlow E., Williamson N.M., Ralston R., Helfman D.M. et Adams T.E. Molecular cloning and in vitro expression of a cDNA clone for human cellular tumor antigen p53. *Mol. Cell. Biol.* 5: 1601-1610, 1985.

15

28. Harlow E. et Lane D. (1988) *Antibodies*, A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

20

29. Maniatis T., Fritsch E.F. et Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning*. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

30. Wade-Evans A. et Jenkins J.R. Precise epitope mapping of the murine transformation - associated protein, p53. *The EMBO Journal* 4, N°3 , 25 699-706, 1985.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: LABORATOIRES EUROBIO
- (B) RUE: 7, Avenue de Scandinavie
- (C) VILLE: LES ULIS CEDEX
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 91953
- (G) TELEPHONE: 69 07 94 77
- (H) TELECOPIE: 69 07 95 34
- (I) TELEX: 681 425 F

(ii) TITRE DE L' INVENTION: FRAGMENTS DE LA PROTEINE P53 ET LEURS UTILISATIONS DANS LA DETECTION ET LE SUIVI D'ETATS PATHOLOGIQUES

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 15

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:

- (A) NUMERO DE DEPOT: FR 9213110
- (B) DATE DE DEPOT: 02-NOV-1992

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 25 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Glu	Pro	Pro	Leu	Ser	Gln	Glu	Thr	Phe	Ser	Asp	Leu	Trp
1					5				10			
Lys		Leu	Leu	Pro	Glu	Asn	Asn	Val	Leu	Ser	Pro	Leu
					15			20				25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 20 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Homo sapiens

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln
1 5 10
Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro
15 20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 15 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Homo sapiens

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu
1 5 10
Trp Lys Leu
15

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 15 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Homo sapiens

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro
1 5 10
Glu Asn Asn
15

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 15 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Homo sapiens

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
1 5 10
Ser Pro Leu
15

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 15 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Homo sapiens

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln
1 5 10
Trp Phe Thr
15

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 15 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Homo sapiens

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp
1 5 10
Pro Gly Pro
15

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 15 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Homo sapiens

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys
1 5 10
Glu Pro Gly
15

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 15 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Homo sapiens

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser
1 5 10
Arg Ala His
15

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 15 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Homo sapiens

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser
1 5 10
His Leu Lys
15

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 15 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Homo sapiens

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His Leu Lys Ser Lys
1 5 10
Lys Gly Gln
15

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 15 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Homo sapiens

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

Ser Ser His Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr
1 5 10
Ser Arg His
15

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 15 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Homo sapiens

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys
1 5 10
Leu Met Phe
15

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 15 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe Lys Thr
1 5 10
Glu Gly Pro
15

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 13 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

Lys Lys Leu Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser
1 5 10
Asp

REVENDICATIONS

1. Peptide, à l'exclusion de la protéine p53, présentant une réaction spécifique vis-à-vis d'anticorps anti-p53 présents dans les fluides biologiques de patients atteints d'un cancer ou précancéreux.

2. Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que les anticorps sont ceux de patients atteints d'un cancer quel que soit son origine.

3. Peptide selon l'une des revendications 1 et 2 , caractérisé en ce qu'il est compris dans la séquence des amino acides 1 à 112 de la protéine p53.

4. Peptide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend en partie ou en totalité l'une des séquences suivantes :

Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser
Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
Ser Pro Leu (SEQ ID NO:1)

Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile
Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro (SEQ ID
NO:2).

5. Peptide selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend en partie ou en totalité l'une des séquences suivantes :

Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser
Asp Leu Trp Lys Leu (SEQ ID NO:3)

Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu
Leu Pro Glu Asn Asn (SEQ ID NO :4)

Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn
Val Leu Ser Pro Leu (SEQ ID NO: 5)

Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile
Glu Gln Trp Phe Thr (SEQ NO : 6)

Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr
Glu Asp Pro Gly Pro (SEQ ID NO:7).

6. Peptide selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'il est compris dans la séquence des amino-acides 350 à 393 de la protéine p53.

5 7. Peptide selon l'une des revendications 1, 2 et 6, caractérisé en ce qu'il comprend en partie ou en totalité l'une des séquences suivantes :

Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp Ala Gln Ala
Gly Lys Glu Pro Gly (SEQ ID NO : 8)

10 Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly
Gly Ser Arg Ala His (SEQ ID NO : 9)

Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His
Ser Ser His Leu Lys (SEQ ID NO: 10)

15 Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His Leu Lys
Ser Lys Lys Gly Gln (SEQ ID NO: 11)

Ser Ser His Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln
Ser Thr Ser Arg His (SEQ ID NO: 12)

Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His
Lys Lys Leu Met Phe (SEQ ID NO: 13)

20 Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe
Lys Thr Glu Gly Pro (SEQ ID NO: 14)

Lys Lys Leu Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro
Asp Ser Asp (SEQ ID NO:15).

25 8. Séquence nucléotidique codant pour la
synthèse d'un peptide selon l'une des revendications 1
à 7.

9. Utilisation d'un peptide selon l'une des
revendications 1 à 7 pour la détection ou le suivi
d'états pathologiques .

30 10. Utilisation selon la revendication 9 pour
la détection ou le suivi de l'évolution d'états
cancéreux et pré-cancéreux.

35 11. Procédé pour la détermination de la
présence ou pour le dosage d'anticorps dans un fluide
ou tissu caractérisé en ce que:

- on met en présence le fluide ou tissu et l'un des peptides selon l'une des revendications 1 à 7, et

- on détermine la présence soit de l'anticorps soit du peptide soit du couple anticorps-peptide et on effectue le dosage correspondant .

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que les anticorps à doser ou dont on détermine la présence sont des anticorps représentatifs d'états pathologiques .

10 13. Procédé selon l'une des revendications 11 et 12 , caractérisé en ce que ledit peptide est fixé sur une phase solide .

15 14. Procédé selon l'une des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que les complexes formés sont révélés à l'aide d'un anticorps réagissant spécifiquement avec les anticorps à doser ou dont on détermine la présence .

20 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'anticorps permettant la révélation des complexes est conjugué à un marqueur .

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que le marqueur est un enzyme , une molécule chimioluminescente, bioluminescente, fluorescente ou radioactive .

25 17. Coffret pour le dosage et la détermination d'anticorps , caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

- une préparation d'un ou plusieurs peptides selon l'une des revendications 1 à 7, et

30 - un moyen permettant la révélation de la réaction entre l'un de ces peptides et les anticorps à doser .

18. Coffret selon la revendication 17 , caractérisé en ce que le complexe peptide-anticorps formé lors de la réaction est révélé par un anticorps

conjugué à un marqueur.

19. Coffret selon la revendication 18,
caractérisé en ce que le marqueur est un enzyme, une
molécule chimioluminescente, bioluminescente,
5 fluorescente ou radioactive .

1/8

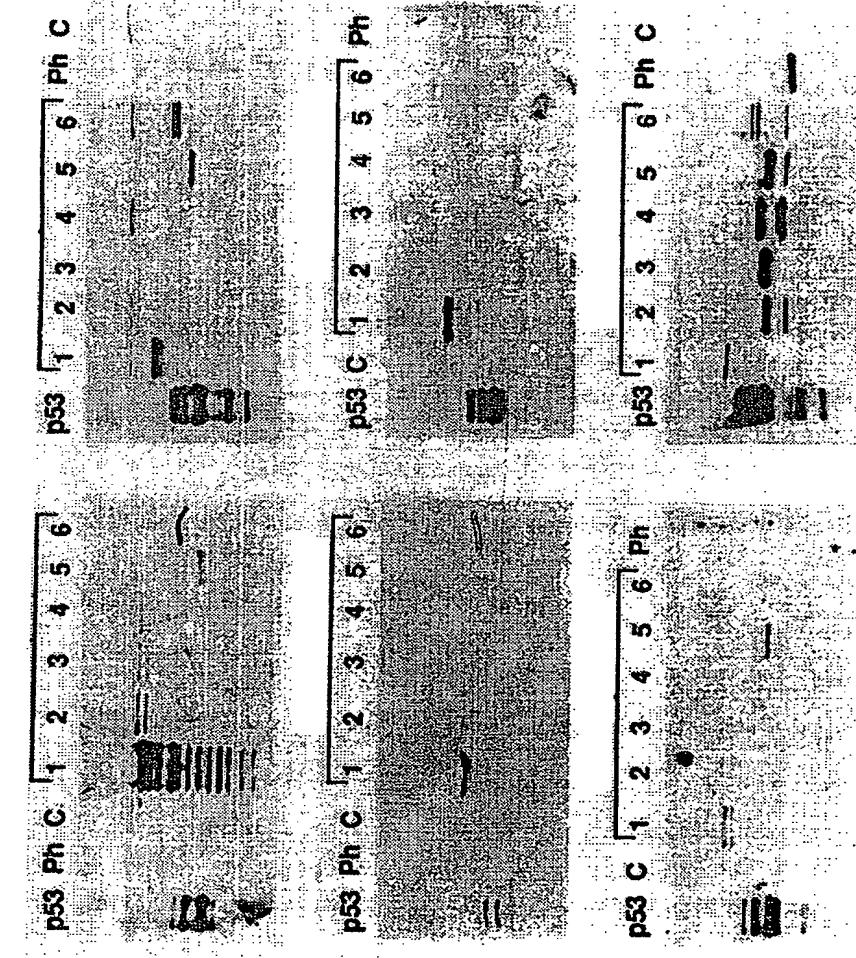


FIG. 1A

FIG. 1B

FIG. 1D

FIG. 1F

FIG. 1C

FIG. 1E

2 / 8

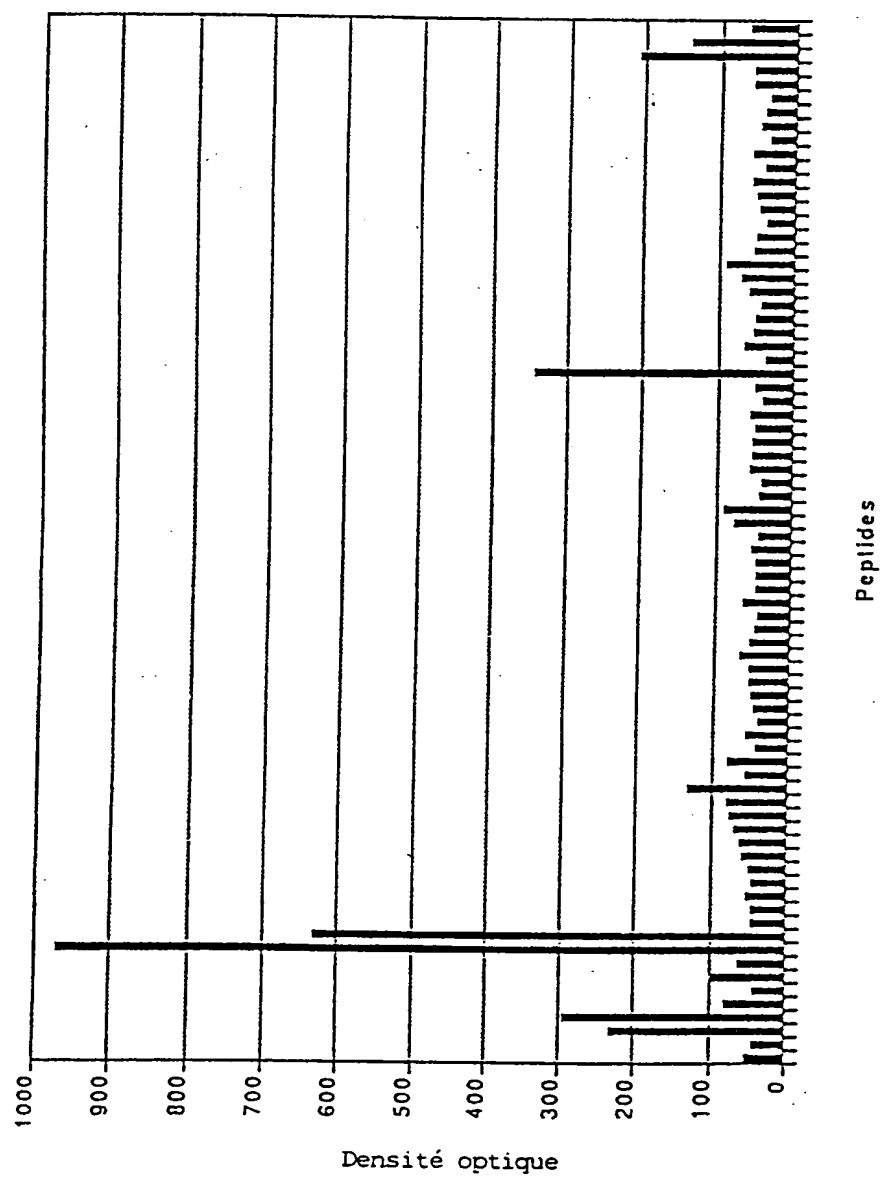


FIG. 2

3 / 9

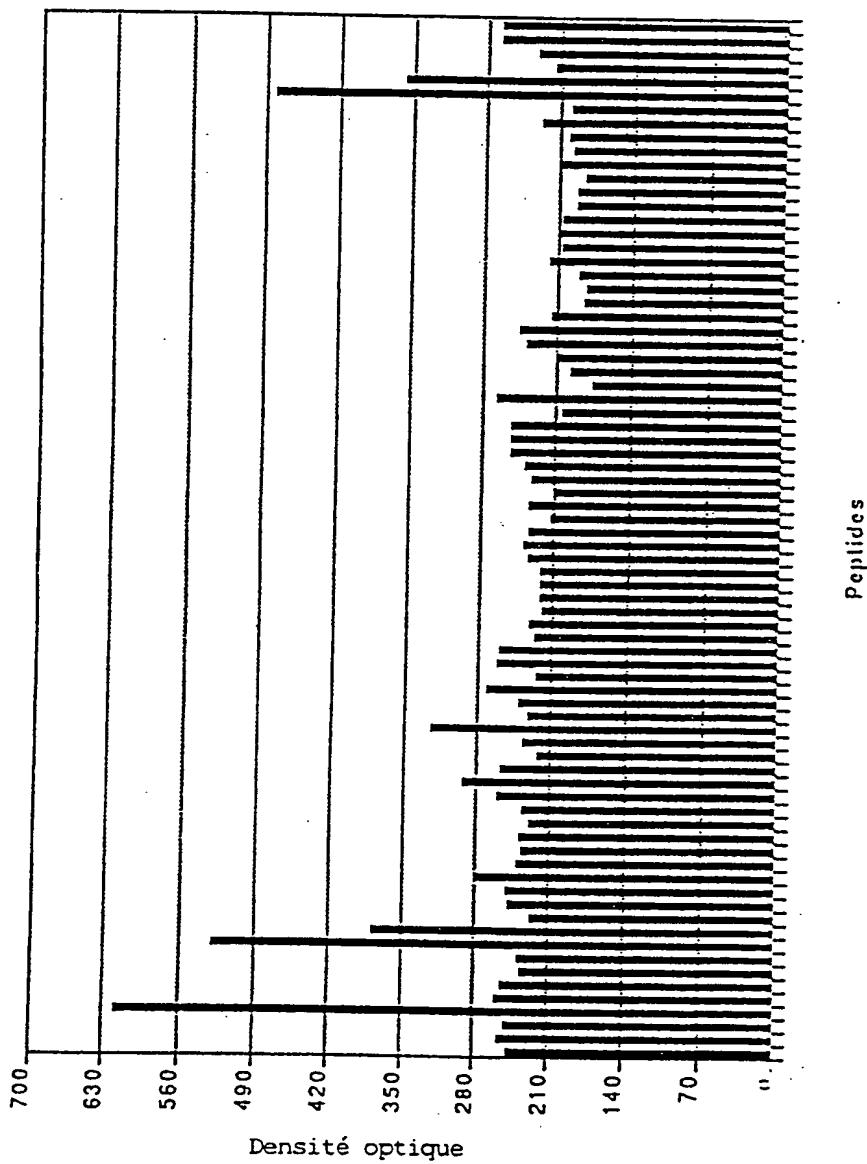


FIG. 3

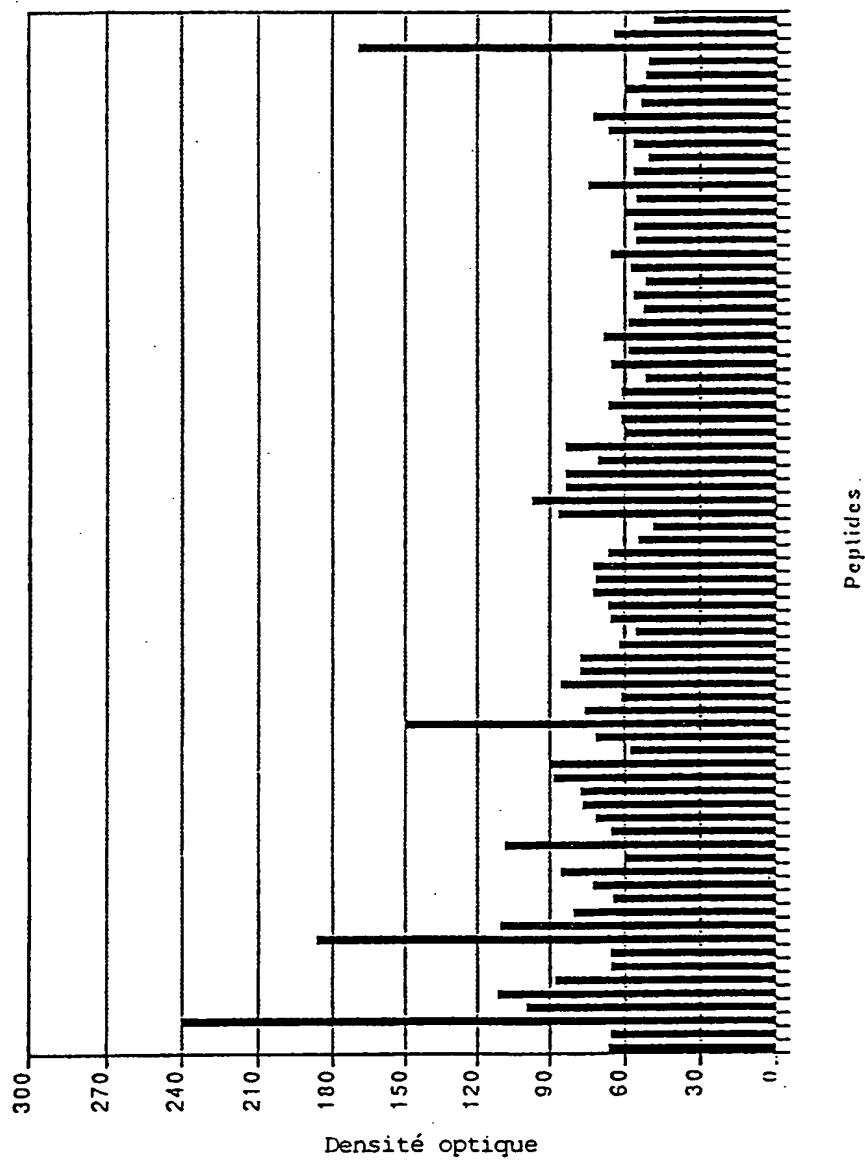


FIG. 4

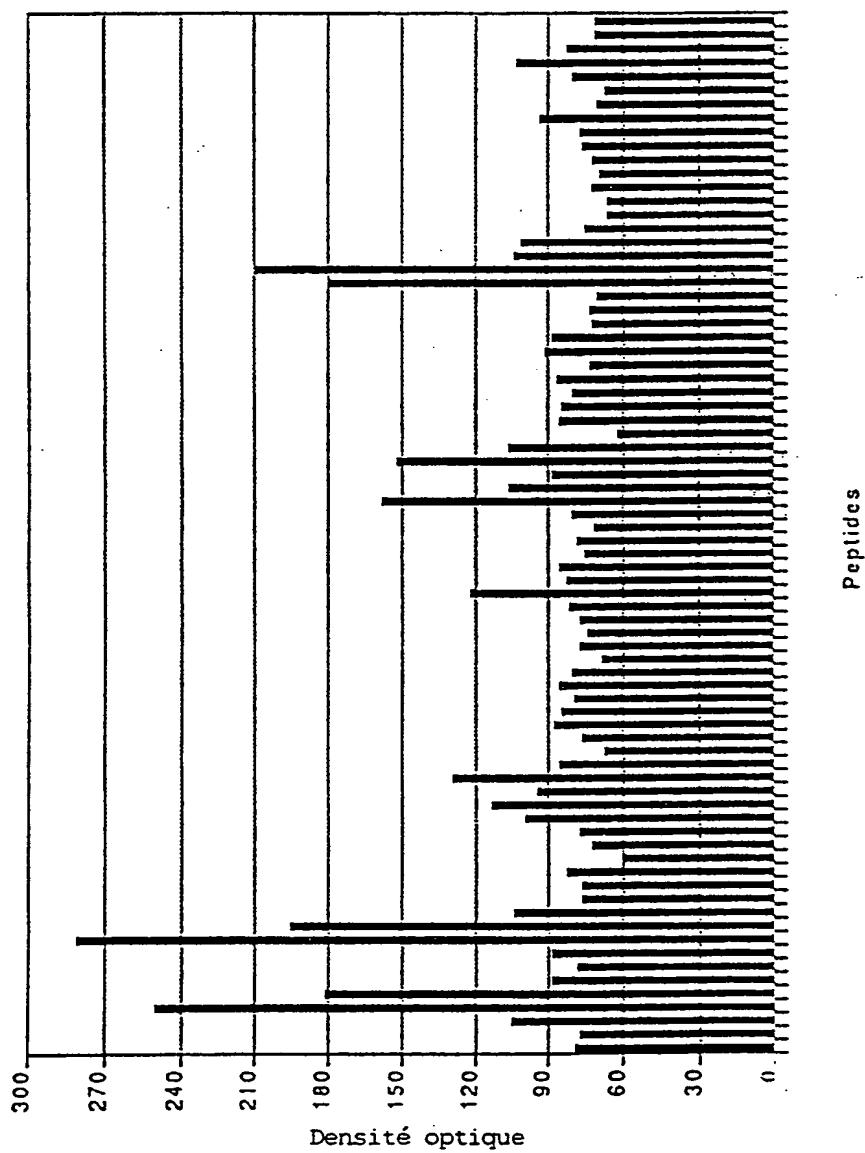


FIG. 5

6/8

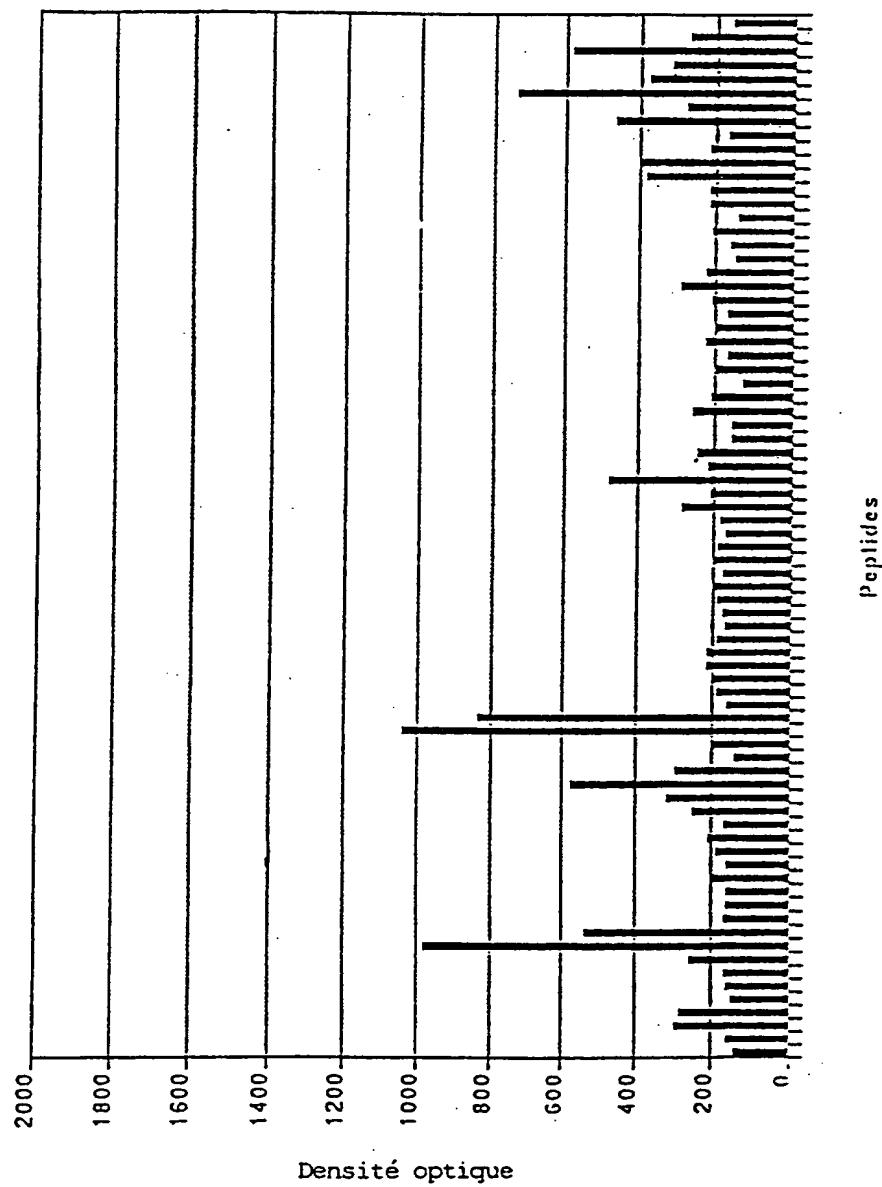


FIG. 6

7/8

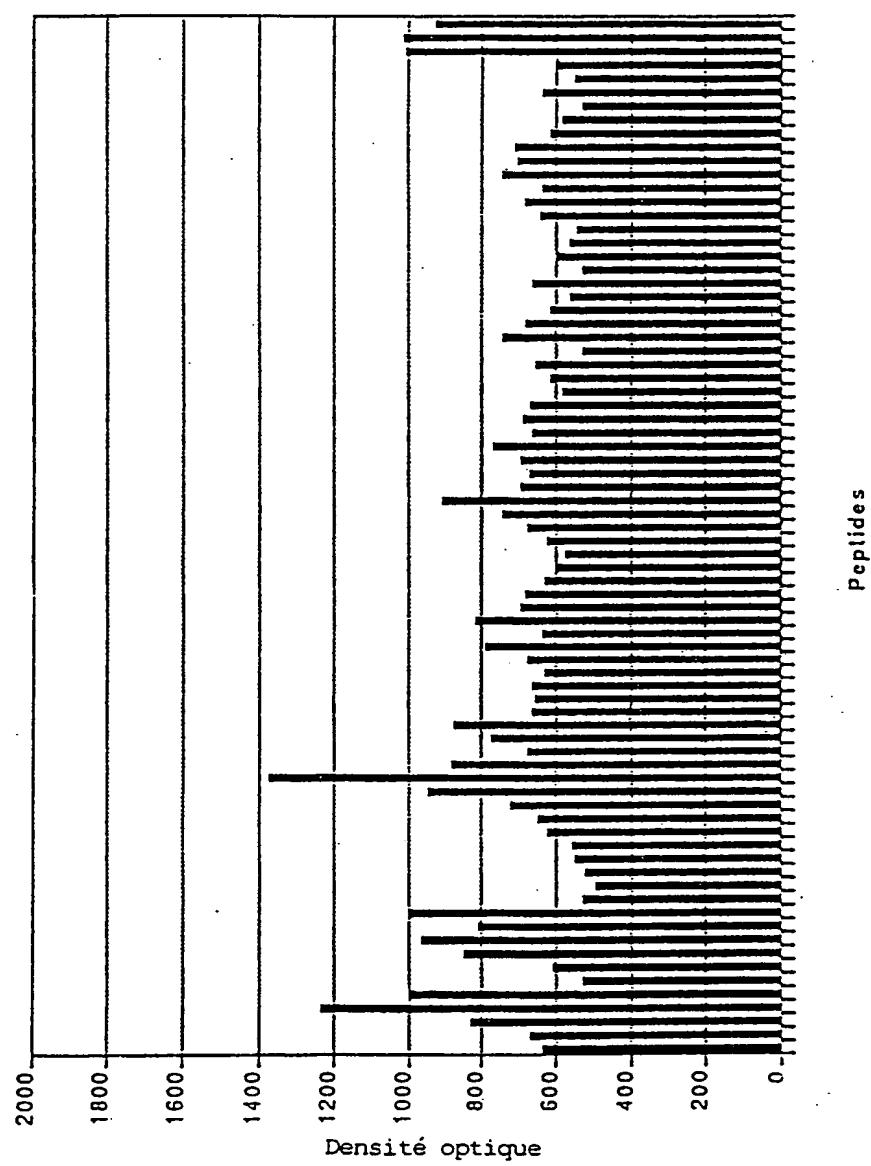


FIG. 7

8 / 8

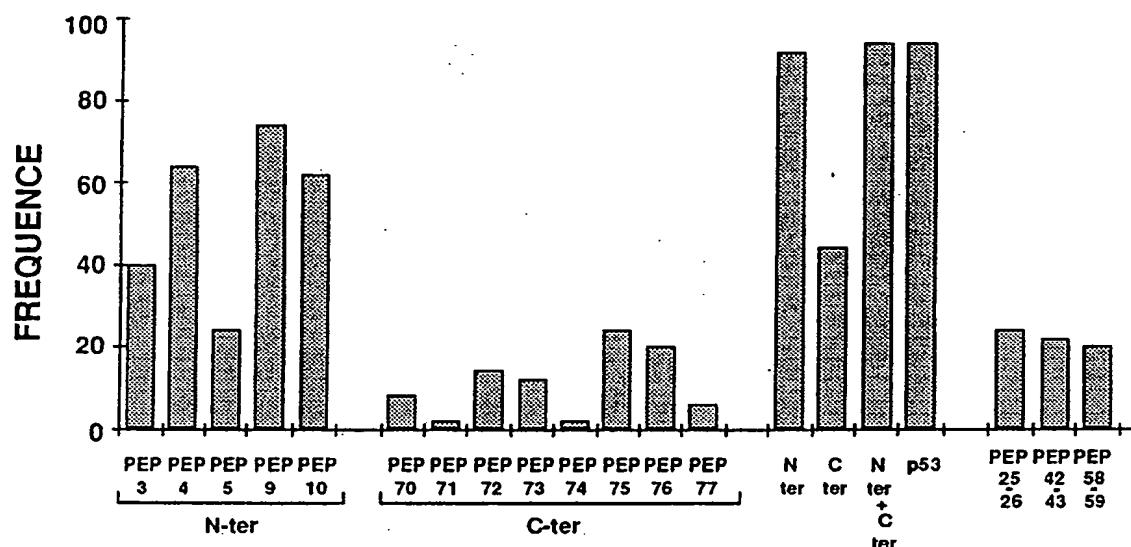


FIGURE 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Appl. No.
PCT/FR 93/01082

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 C12N15/12 C07K7/08 C07K7/10 G01N33/574 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 5 C12N C07K G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EUR. J. BIOCHEM. vol. 159, no. 3 , September 1986 , SPRINGER VERLAG, BERLIN, BRD; pages 529 - 534 L. BANKS ET AL. 'Isolation of human-p53-specific monoclonal antibodies and their use in the studies of human p53 expression' cited in the application see page 530, right column, line 20 - page 533, right column, line 38; figures 1-7 ---	1-8
Y	EP,A,0 390 323 (THE JOHN HOPKINS UNIVERSITY) 3 October 1990 see page 8, right column, line 34 - line 50 ---	9-19
X	EP,A,0 390 323 (THE JOHN HOPKINS UNIVERSITY) 3 October 1990 see page 8, right column, line 34 - line 50 ---	8
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

17 February 1994

Date of mailing of the international search report

17-02-1994

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 cpo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In	national Application No
PCT/FR 93/01082	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>INTERNATIONAL J. CANCER vol. 30 , 1982 , INT. J. CANCER, GENEVA, CH; pages 403 - 408</p> <p>L.V. CRAWFORD ET AL. 'Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer' cited in the application see page 405, right column, line 17 - line 23 see page 407, left column, line 1 - page 408, left column, line 8 ---</p>	9-19
Y	<p>EMBO JOURNAL vol. 4, no. 3 , March 1985 , IRL PRESS LIM., OXFORD, ENGL.; pages 699 - 706</p> <p>A. WADE-EVANS ET AL. 'Precise epitope mapping of the murine transformation-associated protein, p53' cited in the application see page 704, right column, paragraph 2 - page 705, left column, paragraph 4; table I ---</p>	9-19
A	<p>MOL. CELL. BIOL. vol. 5, no. 7 , July 1985 , AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, D.C. US;</p> <p>E. HARLOW ET AL. 'Molecular cloning and in vitro expression of a cDNA clone for human cellular tumor antigen p53' cited in the application see page 1602, right column, paragraph 2 - page 1605, right column, line 1; figure 4 ---</p>	1-19
A	<p>EP,A,0 204 922 (ABBOTT LABORATORIES) 17 December 1986 see page 3, line 13 - page 4, line 10 ---</p>	1-19
P,X	<p>JAPANESE PATENTS ABSTRACTS (UNEXAMINED) Week 9338, 24 August 1993 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-299650 & JP,A,5 213 994 (KOUHASHI S, NICHIREI KK) 24 August 1993 see abstract ---</p>	1-5
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte
rnal Application No
PCT/FR 93/01082

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>CANCER REASERCH vol. 52, no. 22 , 15 November 1992 , WARVERLY PRESS INC., BALTIMORE,US; pages 6380 - 6384</p> <p>B. SCHLICHTHOLZ ET AL. 'The immune response to p53 in breast cancer patients is directed against immunodominant epitopes unrelated to the mutational hot spot' see page 6380, left column, line 1 - page 6383, right column, line 29 ---</p>	1-19
P,X	<p>BULLETIN DU CANCER vol. 80, no. 2 , 26 February 1993 , ELSEVIER,PARIS,FR; pages 102 - 110</p> <p>Y. LEGROS ET AL. 'Production of human p53 specific monoclonal antibodies and their use in immunohistochemical studies of tumor cells' see page 103, right column, paragraph 3; table I ---</p>	1-8
P,X	<p>WO,A,93 20238 (THE JOHN HOPKINS UNIVERSITY) 14 October 1993 see claims 42-45; figure 6 ---</p>	1-5
E	<p>WO,A,93 24525 (RIJKSUNIVERSITEIT LEIDEN) 9 December 1993 see claims 1-3; table I -----</p>	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 93/01082

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0390323	03-10-90	JP-A-	4004898	09-01-92
EP-A-0204922	17-12-86	JP-A-	61275655	05-12-86
WO-A-9320238	14-10-93	AU-B-	4278893	08-11-93
WO-A-9324525	09-12-93	NONE		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem	Internationale No
PCT/FR 93/01082	

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE		
CIB 5	C12N15/12	C07K7/08
		C07K7/10
		G01N33/574
		G01N33/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 5 C12N C07K G01N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications vues
X	EUR. J. BIOCHEM. vol. 159, no. 3 , Septembre 1986 , SPRINGER VERLAG, BERLIN, BRD; pages 529 - 534 L. BANKS ET AL. 'Isolation of human-p53-specific monoclonal antibodies and their use in the studies of human p53 expression' cité dans la demande voir page 530, colonne de droite, ligne 20 - page 533, colonne de droite, ligne 38; figures 1-7 ---	1-8
Y	voir page 530, colonne de droite, ligne 20 - page 533, colonne de droite, ligne 38; figures 1-7 ---	9-19
X	EP,A,0 390 323 (THE JOHN HOPKINS UNIVERSITY) 3 Octobre 1990 voir page 8, colonne de droite, ligne 34 - ligne 50 ---	8
	-/-	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- 'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- 'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- 'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- 'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- 'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- 'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- 'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- 'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- '&' document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
17 Février 1994	04 -03- 1994
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Hornig, H

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. : Internationale No
PCT/FR 93/01082

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications vues
Y	<p>INTERNATIONAL J. CANCER vol. 30 , 1982 , INT. J. CANCER, GENEVA, CH; pages 403 - 408 L.V. CRAWFORD ET AL. 'Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer' cité dans la demande voir page 405, colonne de droite, ligne 17 - ligne 23 voir page 407, colonne de gauche, ligne 1 - page 408, colonne de gauche, ligne 8 ---</p>	9-19
Y	<p>EMBO JOURNAL vol. 4, no. 3 , Mars 1985 , IRL PRESS LIM., OXFORD, ENGL.; pages 699 - 706 A. WADE-EVANS ET AL. 'Precise epitope mapping of the murine transformation-associated protein, p53' cité dans la demande voir page 704, colonne de droite, alinéa 2 - page 705, colonne de gauche, alinéa 4; tableau I ---</p>	9-19
A	<p>MOL. CELL. BIOL. vol. 5, no. 7 , Juillet 1985 , AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, D.C. US; E. HARLOW ET AL. 'Molecular cloning and in vitro expression of a cDNA clone for human cellular tumor antigen p53' cité dans la demande voir page 1602, colonne de droite, alinéa 2 - page 1605, colonne de droite, ligne 1; figure 4 ---</p>	1-19
A	<p>EP,A,0 204 922 (ABBOTT LABORATORIES) 17 Décembre 1986 voir page 3, ligne 13 - page 4, ligne 10 ---</p>	1-19
P,X	<p>JAPANESE PATENTS ABSTRACTS (UNEXAMINED) Week 9338, 24 Août 1993 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-299650 & JP,A,5 213 994 (KOUHASHI S, NICHIREI KK) 24 Août 1993 voir abrégé ---</p>	1-5
1		-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. de Internationale No
PCT/FR 93/01082

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	CANCER REASERCH vol. 52, no. 22 , 15 Novembre 1992 , WARVERLY PRESS INC., BALTIMORE,US; pages 6380 - 6384 B. SCHLICHTHOLZ ET AL. 'The immune response to p53 in breast cancer patients is directed against immunodominant epitopes unrelated to the mutational hot spot' voir page 6380, colonne de gauche, ligne 1 - page 6383, colonne de droite, ligne 29 --- BULLETIN DU CANCER vol. 80, no. 2 , 26 Février 1993 , ELSEVIER,PARIS,FR; pages 102 - 110 Y. LEGROS ET AL. 'Production of human p53 specific monoclonal antibodies and their use in immunohistochemical studies of tumor cells' voir page 103, colonne de droite, alinéa 3; tableau I --- WO,A,93 20238 (THE JOHN HOPKINS UNIVERSITY) 14 Octobre 1993 voir revendications 42-45; figure 6 --- E WO,A,93 24525 (RIJKSUNIVERSITEIT LEIDEN) 9 Décembre 1993 voir revendications 1-3; tableau I -----	1-19
P,X		1-8
P,X		1-5
E		1-3

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No
PCT/FR 93/01082

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0390323	03-10-90	JP-A- 4004898	09-01-92
EP-A-0204922	17-12-86	JP-A- 61275655	05-12-86
WO-A-9320238	14-10-93	AU-B- 4278893	08-11-93
WO-A-9324525	09-12-93	AUCUN	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.